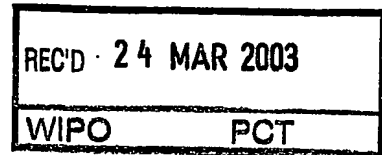


10/500.646  
2/25/05

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

BEST AVAILABLE COPY

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 JAN. 2003

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

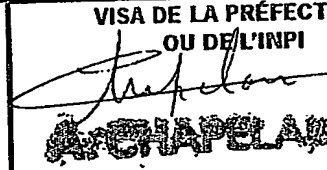
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>10 JAN 2002</b> LIEU <b>69 INPI LYON</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0200265</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>10 JAN. 2002</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> Cabinet GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> IT/SC/B05B3851FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> PROCÉDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE L'ESPECE ANIMALE D'ORIGINE DE LA MATIERE ANIMALE CONTENUE DANS UN ECHANTILLON			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> Date <input type="text"/> Pays ou organisation <input type="text"/> N° <input type="text"/> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		BIO MERIEUX	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme	
	Code postal et ville	69280	MARCY L'ETOILE
Pays		FR	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

10 JAN 2002 REMISE DES PIÈCES DATE 69 INPI LYON LIEU 0200265 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		IT/SC/B05B3851FR	
<b>6 MANDATAIRE</b>			
Nom		GUERRE	
Prénom		Dominique	
Cabinet ou Société		Cabinet GERMAIN & MAUREAU	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		CPI 921104	
Adresse	Rue	BP 6153	
	Code postal et ville	69466	LYON CEDEX 06 / FR
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		04 72 69 84 30	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		04 72 69 84 31	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		dominique.guerre@germainmaureau.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Dominique GUERRE CPI 921104		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  A. CHAPELAIN	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention a trait au domaine de la détermination d'une espèce animale appelée ci-après d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient, lui-même obtenu à partir d'au moins ladite espèce. Les produits à partir desquels s'exerce la détermination selon  
5 la présente invention sont par exemple des aliments ou denrées alimentaires à destination de l'homme ou des animaux, des produits cosmétiques, et, de manière générale des produits susceptibles de contenir des ingrédients d'origine animale, ou au contraire des produits dans lesquels ces extraits sont interdits.

10 Par exemple, l'identification des espèces animales présentes dans les aliments peut être nécessaire dans de nombreux domaines d'activités. Une première raison est de lutter contre les fraudes alimentaires où sont substituées certaines espèces animales par des espèces moins chères, comme le remplacement de lièvre par du lapin. Une seconde raison  
15 est de santé publique, comme notamment lors de l'épidémie d'encéphalite spongiforme bovine ou ESB, maladie due à l'utilisation de farines animales carnées d'origine bovine pour l'alimentation des bovins. Une troisième raison est d'ordre religieux, afin de vérifier par exemple l'absence de porc dans les aliments. Une quatrième raison est d'ordre législatif, lors  
20 notamment de la vérification de l'absence d'espèces protégées dans les aliments.

Trois principales approches d'identification sont actuellement décrites dans la littérature ; ces méthodes sont basées sur une analyse tissulaire ou microscopique, sur une analyse protéique, et/ou sur une  
25 analyse génétique.

L'analyse tissulaire consiste ainsi à déterminer la présence dans des échantillons de farines destinées à l'alimentation animale, de fragments d'os. Cette technique, décrite notamment dans l'article de Michard, Revue de l'alimentation animale, vol. 508, pp 43-48, 1997, bien que sensible, est  
30 fastidieuse et repose sur l'interprétation d'un expert. Elle est donc difficilement comparable d'un laboratoire à un autre. De plus, par nature, elle ne peut détecter l'adjonction de tissus mous, tels que abats, sérum, tissus sanguins, gélatine.

Parmi les analyses protéiques utilisées, on distingue  
35 principalement dans la littérature trois groupes de méthodes permettant l'identification d'espèces animales présentes dans un échantillon donné.

Le premier groupe de méthodes comprend des techniques d'électrophorèse de protéines, qui consiste à détecter les protéines cibles solubles par une coloration enzymatique spécifique. Le diagnostic est obtenu après électrophorèse sur gel polyacrylamide par exemple. Toutefois, cette technique ne peut être réalisée qu'avec des tissus frais ou congelés, non transformés, car une période de cuisson de l'aliment est un exemple de transformation susceptibles d'altérer les protéines. Cette technique ne peut donc pas être appliquée à la détection d'espèces animales présentes dans les farines végétales, qui subissent lors de leur fabrication des phases de cuisson.

Le deuxième groupe de méthodes est basé sur des techniques immunologiques, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines cibles solubles. La technique « Ouchterlony », ou immunodiffusion double, méthode utilisée pour différencier des antigènes dans un mélange, peut être utilisée. Mais cette technique présente l'inconvénient majeur d'impliquer des réactions croisées avec les épitopes d'autres espèces. L'utilisation de techniques ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) permet une meilleure discrimination entre les espèces, et ces techniques peuvent être appliquées à de la viande cuite lorsque des anticorps dirigés contre des épitopes thermorésistants sont utilisés. Toutefois, des problèmes de spécificité sont encore observés. A titre indicatif, des anticorps polyclonaux dirigés contre les épitopes thermorésistants de poulet ne sont pas suffisamment spécifiques pour déterminer s'il s'agit de viande de poulet ou de viande de dinde.

Le troisième groupe de méthodes comprend les techniques chromatographiques (HPLC) utilisées pour caractériser des protéines solubles de muscles. Toutefois, ces techniques restent lourdes financièrement et techniquement, et ne peuvent être appliquées qu'à des tissus frais ou récemment congelés.

Les inconvénients de ces trois méthodes sont principalement dus à leur dépendance envers la caractérisation de protéines qui sont thermosensibles, se dénaturent lors d'une période de cuisson des aliments, perdent leur activité biologique après la mort de l'animal, et dont la présence est souvent fonction du type de cellules qui est examiné.

Il est ainsi préférable d'analyser directement l'ADN, plutôt que les protéines de l'échantillon, pour identifier la ou les espèces animales

d'origine présentes dans un échantillon donné, l'ADN étant identique dans tous les types cellulaires d'un même animal et stable en comparaison avec les protéines. Une troisième approche consiste donc à analyser l'ADN présent dans l'échantillon. Depuis peu de temps, on trouve ainsi dans la

5 littérature des méthodes basées notamment sur l'utilisation d'enzymes de restriction ou de marqueurs génétiques, ces méthodes présentant l'avantage de pouvoir être appliquées à des produits transformés, en particulier après traitement thermique.

La détermination nucléique peut faire appel à des enzymes de

10 restriction, ou technique dite RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, voir notamment Meyer et al, Journal of AOAC International, vol 78 n°6, pp 1542-1551, 1995). Les enzymes de restriction coupent l'ADN, préalablement extrait de l'échantillon à analyser, à des endroits précis de la macromolécule. Il suffit alors de comparer, par simple

15 électrophorèse, les fragments obtenus avec ceux d'échantillons témoins représentatifs de l'espèce à identifier. Toutefois, l'analyse des résultats obtenus par cette technique est très délicate, en particulier lorsque plusieurs espèces animales sont présentes dans l'échantillon.

La détermination nucléique peut aussi consister à séquencer un

20 marqueur ubiquitaire, tel que le cytochrome B de l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial est une cible connue pour ce genre d'analyse puisque chaque mitochondrie contient de une à dix molécules d'ADN mitochondrial, et chaque cellule renferme de quelques dizaines à quelques milliers de mitochondries, ce qui permet de travailler sur une très faible quantité

25 d'échantillon. Ainsi, Bartlett & Davidson (Biotechniques, vol. 12, n°3, 1992) décrivent une méthode appelée FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). Cette méthode consiste à i) isoler l'ADN présent dans un échantillon biologique, ii) amplifier cet ADN par PCR par l'utilisation d'amorces spécifiques du gène cytochrome B mitochondrial, les

30 amorces étant choisies dans la partie du gène hautement conservée au cours de l'évolution et iii) séquencer le segment d'ADN amplifié. La séquence est ensuite utilisée pour une analyse phylogénétique à l'aide d'une base de données, permettant l'identification de l'espèce animale présente initialement dans l'échantillon. Si cette méthode présente

35 l'avantage d'être rapide et utilisable sur tout type d'aliments (frais, congelés, transformés...), elle présente toutefois l'inconvénient majeur de

ne pas permettre l'analyse de mélanges d'espèces, à partir de mélanges de séquences amplifiées issues du même marqueur polymorphe ubiquitaire, et reste ainsi réservée à des matières premières homogènes.

L'analyse peut également consister à amplifier un marqueur spécifique d'une espèce donnée. Ainsi, Lahiff et al (Molecular and Cellular Probes, vol.15, pp27-35, 2001) décrivent l'identification d'espèce ovine, bovine ou aviaire présente dans un échantillon par l'utilisation par PCR d'amorces particulières, spécifiques à chaque espèce. Si cette méthode permet l'identification spécifique et rapide de telle ou telle espèce, elle ne peut être appliquée simultanément à la détection de plusieurs espèces. Des PCR successives sont alors nécessaires si on souhaite détecter plusieurs espèces. On retrouve ainsi dans l'art antérieur la détection de six espèces animales par l'utilisation d'une PCR multiplex (Matsuda et al, 1999 Meat Sciences, (1999), 145-148). Toutefois, cette technique reste délicate et difficile à appliquer et implique pratiquement une connaissance préalable des espèces recherchées. Cette technique n'est cependant pas applicable en aveugle, c'est à dire sans connaissance préalable des espèces susceptibles d'être présentes dans l'échantillon. Elle ne permet pas d'avoir des résultats quantitatifs en raison des difficultés dues à l'amplification multiplex et des possibilités de mésappariements. De plus, cette technique oblige à disposer d'un grand nombre d'amorces spécifiques si l'on veut tester un grand nombre d'espèces, ce qui est peu réalisable en pratique en raison de problèmes de sensibilité et de spécificité. Enfin, si une espèce n'est pas représentée dans le jeu d'amorces mais néanmoins présente dans l'échantillon à analyser, le résultat sera faussé.

Il existe donc un besoin important pour une technique qui, tout en restant générique, puisse détecter une ou plusieurs espèces, même présentes en grand nombre dans le même échantillon à analyser ou en très faible quantité, et sans connaissance préalable des espèces présentes.

En effet, si dans un produit, l'espèce non désirée doit être présente dans des quantités supérieures à 5 % par rapport à l'espèce normalement présente pour qu'il y ait effectivement fraude, ce qui allège les performances exigées pour le test de diagnostic moléculaire, il en est autrement dans le cas de produits dans lesquels la présence de produits d'origine animale est interdite. Par exemple dans le cas des farines employées en France pour l'alimentation animale depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2001,



les traces de teneur en produit d'origine animale sont recherchées, et la contrainte technique est importante en terme de sensibilité de la méthode car la majeure partie du matériel est d'origine végétale et l'adjonction de matériel animal varie entre 0,1 et 5% poids/poids.

5 Il existe donc un besoin de disposer d'un outil de détermination, permettant l'identification ou la détection qualitative et/ou quantitative d'espèces animales, en aveugle, c'est à dire sans a priori sur l'identité de l'espèce recherchée, susceptible d'être mis en œuvre de manière simple, tout en restant spécifique, fiable et fidèle, et susceptible d'être mis en  
10 œuvre dans un milieu pouvant contenir des ingrédients obtenus à partir de plusieurs espèces animales.

Le problème à résoudre présente une complexité importante. La détermination doit être possible en aveugle, c'est à dire que l'échantillon est susceptible de contenir ou de ne pas contenir des ingrédients obtenus à  
15 partir d'une ou de plusieurs espèces animales et ces espèces d'origine sont inconnues. Si l'échantillon contient des ingrédients obtenus à partir d'espèces animales, les espèces d'origine doivent être déterminées et sont susceptibles d'être voisines, et la détermination doit être possible en ne faisant qu'une seule analyse, avec un seul réactif et une seule étape  
20 d'amplification, sans étape préalable de prédétermination par exemple du groupe d'espèces ou mise en œuvre de batteries de tests permettant par exemple de classer les réactifs par genres ou espèces pour éviter par exemple les réactions croisées.

A cet effet, la Demanderesse a découvert un ensemble de  
25 séquences constitué par le groupe comprenant les séquences SEQ ID Nos 1 à 232, leurs séquences respectivement complémentaires, et toutes séquences homologues, comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, qui permettent par la  
30 mise en œuvre de méthodes d'analyse dites de biologie moléculaire, la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce.

Avant d'exposer l'invention, différents termes utilisés dans la  
35 description et les revendications sont définis ci-après.

- Une "détermination" s'entend comme étant l'identification ou la détection ou analyse quantitative et/ou qualitative d'une espèce animale.

- Une "espèce animale" s'entend comme étant la catégorie la plus simple utilisée dans le classement des espèces vivantes ou taxonomie.

5 Les espèces vivantes sont classées en catégories appelées taxons, les plus importants taxons sont le Règne (animal ou végétal), l'Embranchement, la Classe, l'Ordre, la Famille, le Genre, et l'Espèce. Les Oiseaux, Poissons et Mammifères sont des classes d'animaux vertébrés.

~~- Par "espèce animale d'origine" on entend l'espèce animale,~~

10 de l'animal dont les tissus, quels qu'ils soient, ont été utilisé comme matière première pour la préparation du ou des ingrédients de l'échantillon. du produit soumis à la détermination selon la présente invention.

- Une "méthode de biologie moléculaire", est une méthode basée sur l'amplification enzymatique de cibles nucléiques (ADN et/ou  
15 ARN) in vitro et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques.

- Un "échantillon" est toute partie obtenue directement ou indirectement à partir d'un produit, d'un matériau, d'une matière, de départ, lui-même susceptible de contenir au moins un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale dite d'origine. En conséquence de  
20 cette définition, l'échantillon à déterminer conformément à la présente invention est susceptible de contenir ledit ingrédient d'origine animale, à partir duquel on identifie ou détecte la ou les espèces animales entrées dans la composition ou constitution du produit, matériau, ou matière de départ. Au sens de la présente invention, le produit de départ peut être un  
25 matériel biologique, un aliment ou denrée alimentaire, par exemple à base de viande ou poisson, un produit cosmétique, etc..

- Par "étape de lyse", on entend une étape capable de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des microorganismes (comme des débris cellulaires qui perturbent les  
30 réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet de la Demanderesse :

WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique,

WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et

WO-A-99/15321 sur la lyse mécanique.

35 L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues, telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses

chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US-A-5,234,809).

- Par "purification", on entend la séparation entre les acides nucléiques et les autres constituants cellulaires relargués dans l'étape de lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet déposées par la Demanderesse sous les références suivantes : WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même recouverte par une couche externe à base d'un polymère susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, par exemple acide nucléique ; le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C. Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères cationiques, qui génèrent un polymère ayant la capacité de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

Un autre exemple intéressant de méthode de purification des acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne (nécessaires Qiagen par exemple), soit sous forme de particules inertes [Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503] ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines échangeuses d'ions en colonne (nécessaires Qiagen par exemple) ou en format particulière paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) [Levison

PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344]. Une autre méthode très pertinente mais non exclusive pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-Bind™).

- Une "séquence", ou un "fragment nucléotidique", ou un oligonucléotide, ou un polynucléotide, est un enchaînement de motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique, l'enchaînement ~~pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à~~ partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique.

- Un "motif" est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée ; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991), soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates,

- Par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels.

- Par "hybridation", on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de former un double brin avec des liaisons hydrogène stables et spécifiques. Un fragment nucléotidique "capable de s'hybrider" avec un polynucléotide est

un fragment pouvant s'hybrider avec ledit polynucléotide dans des conditions d'hybridation, qui peuvent être déterminées dans chaque cas de façon connue. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la stringence, c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques.

La "stringence" peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépendra principalement des sondes cibles utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.

En général, selon la longueur des sondes cibles utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 70°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1 M.

- Une "sonde" comprend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 monomères, notamment de 6 à 35 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique ayant, dans le cas présent, une séquence nucléotidique comprise par exemple dans un ARN ribosomique, l'ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN ribosomique et l'ADN (appelé ici ADN ribosomique ou ADNr) dont ledit ARN ribosomique est le produit de transcription ; une sonde peut être de capture ou de détection.

- Une "sonde de capture" est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption.

- Une "sonde de détection" peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes (notamment une peroxydase, une phosphatase alcaline, ou une enzyme susceptible d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des

composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine.

5 - Une "amorce" comprend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification, dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription inverse, etc.

10 - "L'homologie" caractérise le degré d'identité de deux fragments nucléotidiques comparés, dont les critères retenus pour la présente invention sont définis ci-après.

Les sondes et amorces selon l'invention sont choisies parmi :

15 (a) les séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

(b) les séquences complémentaires à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M, avec une quelconque des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

25 (c) les séquences homologues à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, et des séquences complémentaires à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite  
30 quelconque séquence ; à titre d'exemple, un fragment (c) comporte 10 nucléotides parmi lesquels 5 nucléotides contigus appartiennent à une séquence (a) et au moins 2 nucléotides des 5 nucléotides restants sont identiques respectivement aux deux nucléotides correspondants dans la séquence de référence, après alignement.

- Par "séquence d'identification", on désigne toute séquence ou tout fragment tel que défini ci-dessus, pouvant servir de sonde de détection et/ou de capture.

- Par "détection" on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur.

De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., *Clinical Chemistry*, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249].

Par "marqueur", on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêtagalactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase ; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ .

Ainsi, le polynucléotide peut être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléotide triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant un ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans les techniques d'amplification générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA.

Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO-A-91/19812.

Un autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR-A-2 780 059 de la Demanderesse. Un autre mode préférentiel de détection utilise l'activité

exonucléase 5'-3' d'une polymérase, tel que décrit par Holland P.M., PNAS (1991) p 7276-7280.

Des systèmes d'amplification du signal peuvent être utilisés comme décrit dans le document WO-A-95/08000 et, dans ce cas, la  
5 réaction préliminaire d'amplification enzymatique peut ne pas être nécessaire.

- Par "amplification enzymatique", on entend une processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique particulier à l'aide  
~~d'amorces spécifiques par l'action d'au moins une enzyme. Ainsi, pour~~  
10 l'amplification des acides nucléiques, il existe, entre autres, les techniques suivantes :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de  
15 brevet EP-A-0 201 184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- 20 - NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

On parle alors d'"amplicons" pour désigner les polynucléotides  
25 générés par une technique d'amplification enzymatique.

- Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les  
30 polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose ou le dextrane, des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux  
35 minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc.



Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO -A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

- Par "biopuce", on entend un support solide de dimension  
5 réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés dans les publications de [G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, Human Mutation, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al,  
10 Molecular diagnosis, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 1998, n° 16, p. 541-546] ou dans les brevets US-A-4,981,783, US-A-5,700,637, US-A-5,445,934, US-A-5,744,305 et US-A-5,807,522.

15 La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection  
20 multiple des espèces à détecter.

L'invention décrite ci-après permet de résoudre les problèmes posés par les méthodes précédemment décrites, à la fois en terme de sensibilité, spécificité, capacité de multidétection et identification, tout en étant rapide et facile à mettre en œuvre.

25 L'invention concerne un procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit  
30 échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, choisi dans le groupe constitué par

- les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,  
- les séquences complémentaires à chacune des séquences  
35 SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une

Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO -A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

- Par "biopuce", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés dans les publications de [G. Ramsay, *Nature Biotechnology*, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, *Human Mutation*, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al, *Molecular diagnosis*, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, *Nucleic Acids Research*, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng et al, *Nature Biotechnology*, 1998, n° 16, p. 541-546] ou dans les brevets US-A-4,981,783, US-A-5,700,637, US-A-5,445,934, US-A-5,744,305 et US-A-5,807,522.

La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection multiple des espèces à détecter.

L'invention décrite ci-après permet de résoudre les problèmes posés par les méthodes précédemment décrites, à la fois en terme de sensibilité, spécificité, capacité de multidétection et identification, tout en étant rapide et facile à mettre en œuvre.

L'invention concerne un procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, consistant en au moins une séquence, choisie dans les groupes constitués par

- les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,

- les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une

température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,

5       - les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides  
10       contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et  
d) par détection on détermine tout signal ou information  
15       résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

Elle concerne en outre un procédé tel que décrit précédemment,  
20       caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une même espèce animale d'origine ou de plusieurs  
25       espèces animales d'origine respectivement différentes.

Elle concerne également toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,  
b) les séquences complémentaires à chacune des séquences  
30       SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec  
35       l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,

température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou

- 5       - les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple
- 
- 10       fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

- c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- 15       d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

Elle concerne en outre un procédé tel que décrit précédemment,

20       caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de signaux ou informations caractérisant la présence dans

25       ledit échantillon d'une même espèce animale d'origine ou de plusieurs espèces animales d'origine respectivement différentes.

Elle concerne également toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :

- a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,
- 30       b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec
- 35       l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou

c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

5 Elle concerne également l'utilisation d'une séquence précédemment définie, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce animale.

L'invention peut en outre être une sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification précédemment définie.

15 Elle concerne également une amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification précédemment définie.

20 Un autre mode de réalisation de l'invention est un réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique précédemment définie.

25 Selon l'invention les séquences nucléotidiques ou leurs fragments peuvent être fixés sur un support solide et peuvent constituer une biopuce qui permet la détermination de la multiplicité de signaux ou informations.

30 Le procédé selon l'invention peut être conduit de manière manuelle, semi-automatique ou automatique, permettant la mise en œuvre d'un moyen de détermination de l'espèce animale d'origine de la matière animale contenue dans un échantillon.

35 Cette invention concerne également une méthode de détection utilisant en particulier la technique des biopuces. Cette méthode de détection est spécifique des espèces recherchées grâce à l'utilisation de séquences, dites séquences d'identification de chaque espèce, comme sonde. La rapidité, la sensibilité et la spécificité de cette méthode de détection, permettent de l'appliquer indifféremment à tout milieu. En

particulier cette méthode s'applique à tout échantillon de produit alimentaire, comportant de la matière animale quelque soit son état et les procédés de fabrication et/ou d'élaboration mis en œuvre, en particulier les techniques de cuisson, de déshydratation et/ou de conservation, et à tout échantillon de produit manufacturé susceptible de contenir des extraits animaux, comme par exemple les produits cosmétiques et/ou les produits pharmaceutiques comportant par exemple des gélatines d'origine animale.

Cette détection simultanée en une seule étape de multiples produits d'amplifications spécifiques, est possible grâce à l'utilisation de support solide en particulier sous la forme d'un support solide de dimension réduite où sont fixées une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées, ou « biopuce », ces sondes de capture étant constituées par un jeu de fragments ou de la totalité de séquences nucléotidiques spécifiques dites séquences d'identification des espèces recherchées.

Ces séquences nucléotidiques peuvent également être mises en œuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues comme les techniques de dépôt ponctuel sur filtre dites "DOT-BLOT" [Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982], les techniques de transfert d'ADN dites "SOUTHERN BLOT" [Southern E. M., J. Mol. Biol., 1975, 98, 503], les techniques de transfert d'ARN dites "NORTHERN BLOT", ou les techniques "SANDWICH" [Dunn A.R. et al., Cell, 1977, 12, 23].

La présente invention concerne également la détermination de groupe d'espèces ou classe d'espèces animales ou taxon. Ces groupes d'espèces ou classes ou taxons son constitués par exemple de classe, comme la classe des mammifères, les oiseaux ou les poissons, voire de sous groupes d'espèces comme une famille d'oiseaux ou de deux sous-groupes réunis comme les oiseaux ou les mammifères.

Cette identification est possible grâce à l'identification de séquences nucléotidiques, appelées séquences signatures, caractéristiques d'une classe, d'un groupe, d'un sous-groupe ou d'un taxon, et correspondant à des régions conservées pour l'ensemble des individus constituant le groupe.

Toute séquence signature spécifique à une classe d'animaux mises en œuvre dans le procédé selon la présente invention présente la caractéristique selon laquelle, d'une part elle a une région nucléique

conservée pour pratiquement toutes les espèces animales d'une même classe taxonomique, et d'autre part elle peut être discriminée d'autres séquences répondant à la même définition que précédemment, dans les conditions usuelles de détermination, définies de manière générique dans les revendications en annexe.

Par exemple, pour la détection de la présence de mammifères on utilisera la séquence signature M, correspondant à la séquence SEQ N°235 GACA**CA**ACAA CAGC, positions 14685 à 14698 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases CAA en positions 14689-14690-14691 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de mammifères choisis. La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon.

L'identification de la présence d'oiseaux est déterminée par les signatures :

O1, correspondant à la séquence SEQ N°236 TCCCTAGCCT TCTC, positions 15073 à 15086 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT (positions 15076-15077) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

O2, correspondant à la séquence SEQ N°237 ACACTTGCCG GAAC, positions 15098 à 15111 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT ou CA (positions 15101 - 15102) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le

matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est déterminée par la signature V, correspondant à la séquence SEQ N°238 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases GC (en positions 14886 et 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut  
 5 rechercher, ici les oiseaux et les mammifères. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux et mammifères choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères  
 10 et d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de poissons est déterminée par la signature P, correspondant à la séquence SEQ N°239 ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank n° accession X99772). Les bases ATA ou ATG (positions 14716-14717-  
 20 14718 ) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de poissons choisis. La présence de ces trois  
 25 bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

La présente invention concerne donc également une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

- 30 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
- b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec  
 35 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239,



matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est déterminée par la signature V, correspondant à la séquence SEQ N°238 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases GC (en positions 14886 et 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux et les mammifères. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux et mammifères choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères et d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de poissons est déterminée par la signature P, correspondant à la séquence SEQ N°239 ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank n° accession X99772). Les bases ATA ou ATG (positions 14716-14717-14718 ) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de poissons choisis. La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

La présente invention concerne donc également une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :

- a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
- b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, ou

- c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque
- 5 desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

~~Elle concerne plus particulièrement les séquences nucléotidiques~~

- 10 telles que définies ci-dessus et caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

- Elle concerne également l'utilisation des séquences définies
- 15 précédemment, c'est à dire caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un
- 20 ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

- Ces séquences dites séquences signatures sont choisies parmi
- 25 le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique
- 30 constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239.

- Elle concerne également un réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état
- 35 divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos 235 à 239.

c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque  
 5 desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Elle concerne plus particulièrement les séquences  
 10 nucléotidiques telles que définies ci-dessus et caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

Elle concerne également l'utilisation des séquences définies  
 15 précédemment, c'est à dire caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, pour la détermination d'un  
 20 groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

Ces séquences dites séquences signatures sont choisies parmi  
 25 le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique  
 30 constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases ATA en positions 14716-14718 de SEQ ID N°239.

Elle concerne également un réactif pour la détermination d'au  
 moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état  
 35 divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos 235 à 239.

Elle concerne également le procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

- 5           a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence selon la revendication 10,
- 
- 10           ~~c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et~~
- d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences signatures choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la
- 15           séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases
- 20           ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une classe d'espèces animales d'origine.

Les séquences d'identification peuvent également être mises en

25   œuvre comme amorces spécifiques dans des techniques d'identification par PCR, par mélange de plusieurs amorces choisies parmi les séquences nucléotidiques spécifiques d'une espèce animale en présence d'autres espèces susceptibles d'être présentes dans les milieux à doser, et en ce que au moins une desdites amorces est choisie parmi le groupe constitué

30   par les séquences SEQ ID Nos : 1 à 232, et toutes séquences comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques,

35   choisies parmi le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 240 à SEQ ID N°241 et leur utilisation comme amorces d'amplification universelles, c'est

Elle concerne également le procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

- 5 a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :
  - 1) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
  - 2) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID
  - 10 Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, ou
  - 3) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos
  - 15 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au
  - 20 moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
  - c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
  - d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences signatures choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-
  - 25 14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée
  - 30 des bases ATA en positions 14716-14718 de SEQ ID N°239, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une classe d'espèces animales d'origine.

Les séquences d'identification peuvent également être mises en œuvre comme amorces spécifiques dans des techniques d'identification par PCR, par mélange de plusieurs amorces choisies parmi les séquences

35 nucléotidiques spécifiques d'une espèce animale en présence d'autres espèces susceptibles d'être présentes dans les milieux à doser, et en ce que au moins une desdites amorces est choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos : 1 à 232, et toutes séquences comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70%

40 d'identité avec ladite quelconque séquence

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques, choisies parmi le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 240 à SEQ ID N°241 et leur utilisation comme amorces d'amplification universelles, c'est

à dire utilisables pour la détection d'espèces en mélange et suffisamment sensibles vis à vis des différentes espèces pour éviter des résultats erronés dus au masquage de certaines espèces présentes en très faible proportion en raison de trop grande sensibilité vis à vis d'une autre espèce susceptible d'être présente dans une proportion plus importante.

Ces amorces sont utilisées pour la mise en œuvre des étapes d'amplification des procédés précédemment décrits, notamment lorsque les échantillons comprennent ou sont susceptibles de contenir du matériel biologique provenant d'espèces appartenant au groupe des vertébrés.

10

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

Exemple 1 : Détection d'une espèce animale dans un échantillon (tableau 1)

15

#### a) Préparation de l'échantillon

Des échantillons provenant de plusieurs espèces animales (mammifères, oiseaux, poissons) ont été utilisés dans cet exemple. Ces échantillons se répartissaient en plusieurs catégories :

20 - des échantillons de référence (désignés sous le terme « ref » dans le tableau 1) :

ADN de référence de diverses espèces animales : ADN de mammifères (bœuf, chèvre, mouton, porc, lapin, lièvre, renne), ADN d'oiseaux (autruche, poulet, dinde, oie), ADN de poissons (cabillaud, thon albacore, thon listao, merlu, maquereau espagnol, thonine de l'Atlantique, truite arc-en-ciel, truite de mer, saumon de fontaine)

- des prélèvements tissulaires effectués au laboratoire selon un protocole classique : prélèvement buccal de chèvre, de chat ; souris

30 - des prélèvements alimentaires, dont la composition exacte et l'origine sont connues : blanquette de veau, bœuf Bourguignon, langue de veau en sauce, rôti d'agneau, rôti de porc, cuisse de poulet,

35 - des échantillons commerciaux (désignés sous le terme « comm » dans le tableau 1), obtenus en grande distribution à base de boeuf (foie de veau, beefsteack, côte de veau, vache à lait, rôti de veau, Parmentier, Bolognaise), de porc (jambon, saucisson, saucisse, porc à la chinoise), d'oiseau (steack d'autruche, poulet rôti, pintade rôti, cuisse de

dinde, oie rôtie), de poisson (anguille d'Europe, filet de morue salée, thon albacore en boîte, thon listao en boîte, filet de saumon atlantique, maquereau commun, truite arc-en-ciel, omble chevalier).

Tous les échantillons sont numérotés (E1 à E57), et cette numérotation a été conservée dans les 5 exemples illustrant l'invention.

Chaque échantillon est placé dans un sac type baglight® (Intersciences) puis malaxé jusqu'à homogénéisation dans un malaxeur type BagMixer® (Intersciences).

b) Lyse de 25 mg d'échantillon et purification des ADN totaux

La lyse de l'échantillon et la purification des acides nucléiques est réalisée par l'utilisation du Dneasy™ Tissue Nécessaire (Qiagen, ref 69504) en appliquant le protocole préconisé par Qiagen pour l'extraction et la purification des acides nucléiques de tissus animaux.

c) PCR

Une PCR est réalisée en utilisant le nécessaire Ampli Taq gold de Applied Biosystems suivant le protocole ci dessous. On ajoute à 2µl de la suspension d'ADN total le tampon 10X gold buffer , 3,5mM de Mgcl2, 100µM de dNTPs (deoxyribonucleosides triphosphates), 2U de Taq gold polymérase, 0,4µM des amorces euvertébrés telles que décrites par Bartlett et al en 1992 (Biotechniques vol12n°3 p408.412) :

SEQ ID N°233: 5' CCATCCAACA TCTCAGCATG ATGAAA 3' (séquence CDL)

SEQ ID N°234: 5' **GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC ACACCCCTCA GAATGATATT TGTCCTCA**3' (séquence CBHT7, en gras : promoteur de la polymérase T7), afin d'obtenir 50µl de volume réactionnel final.

Un premier cycle de PCR de 10 minutes est réalisé à 95°C suivi de 35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C pendant 45 secondes, 50°C pendant 45 secondes, 72°C pendant 2 minutes. Une extension finale de 5 minutes à 72°C est ensuite réalisée.

d) Vérification de l'amplification

Afin de vérifier l'amplification, 5 $\mu$ l de produit d'amplification (ou amplicon) sont déposés sur un gel d'agarose 1,5% dans un tampon EDTA-Tris Borate. Après une migration de 20 minutes à 100 Volts, la bande  
5 d'amplification est visualisée par coloration au Bromure d'Ethidium et par illumination aux Ultra Violets. L'amplification est positive comme le démontre la présence d'une bande ayant la taille attendue (350 paires de bases).

10 e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara)

Une biopuce est synthétisée sur un support solide en verre selon le procédé décrit dans le brevet US 5,744,305 (Affymetrix, Fodor et al) en utilisant la stratégie de reséquençage décrite dans la demande WO  
15 95/11995 (Affymax, Chee et al) et selon la méthode décrite par A. Troesch et al. (J. Clin. Microbiol., 37(1) : 49-55, 1999).

Chaque séquence d'identification comporte 17 bases, avec une position d'interrogation en 10<sup>ème</sup> position par rapport à l'extrémité 3' de la séquence.

20 L'analyse est effectuée avec le système complet GeneChip® (référence 900228, Affymetrix, Santa Clara, CA) qui comprend le lecteur GeneArray®, la station fluidique GeneChip® et le logiciel d'analyse GeneChip®.

e. 1. Transcription et marquage des amplicons

25 Grâce à l'amorce antisens CBHT7, tous les produits d'amplification présentent un promoteur pour la RNA polymérase T7. Ces amplicons vont alors servir de matrice à une réaction de transcription au cours de laquelle sera incorporé un ribonucléotide fluorescent.

A partir des 50 $\mu$ l de produit d'amplification positif, un aliquot de  
30 2 $\mu$ l est prélevé et ajouté à un mélange de transcription contenant les composants du nécessaire Megascript T7 (Ambion, ref. 1334) et de fluorescein-12-UTP (Roche, ref. 1427857). Le mélange réactionnel final se fait dans 20 $\mu$ l et la réaction de transcription s'effectue pendant 2 heures à 37°C.



### e. 2. Fragmentation des transcripts marqués

Afin d'améliorer les conditions d'hybridation, les transcripts marqués sont fragmentés en fragments d'environ 20 nucléotides. Pour cela, les 20 $\mu$ l de transcripts marqués sont soumis à l'action de l'imidazole (Sigma) 30mM et du chlorure de manganèse (Merck) 30mM pendant 30 minutes à 65°C.

### e. 3. Hybridation sur la puce à ADN

A partir des 20 $\mu$ l de transcripts marqués et fragmentés, un aliquot de 7 $\mu$ l est prélevé et ajouté à 700 $\mu$ l de tampon d'hybridation (SSPE 6X (Eurobio), DTAB 5mM (Sigma), Bétaine 3M (Acros), antifoam 0,01% (ref A80082, Sigma), et 250  $\mu$ g/ml d'ADN de sperme de hareng (Gibco). Ce mélange est hybridé sur la puce dans les conditions suivantes: 30 minutes à 40°C. Après lavage, la puce est scannée, puis l'image d'hybridation obtenue est analysée par le logiciel GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Les spots d'hybridation permettent de reconstituer la séquence de l'amplicon, qui est ensuite comparée aux séquences de références de la puce. La séquence (et donc l'espèce qui lui correspond) qui présente le meilleur pourcentage d'homologie (appelé aussi « base-call », exprimé en %) avec la séquence de l'amplicon est retenue pour l'identification.

### e.4. Interprétation des résultats.

Seule une partie de la séquence de 350 bases est analysée pour chaque espèce. Elle correspond à tout ou partie des sondes d'identification. Le seuil d'interprétation, c'est à dire le niveau d'identification est fixé à 90% de base-call sur la séquence signature. En dessous de ce seuil, la cible, et donc l'espèce correspondante n'est pas considérée comme identifiée.

### f) Résultat

L'ADN extrait de l'échantillon alimentaire donne lieu à un produit d'amplification, puis à une identification sur la puce. Comme présenté dans le tableau 1, les échantillons de référence sont correctement analysés par cette technique, qui permet également la détection d'espèce animale (mammifère, oiseau, poisson) dans des échantillons commerciaux.

Tableau 1 : détection d'une espèce animale dans un échantillon

Espèce animale	Nature de l'échantillon		% base call Séquence signature	Identification sur puce
Boeuf ( <i>Bos taurus</i> )	ref	E1: ADN boeuf	Bos taurus 100%	boeuf
		E2: Bourguignon	Bos taurus 100%	boeuf
		E3: langue de veau	Bos taurus 100%	boeuf
		E4: blanquette de veau	Bos taurus 100%	boeuf
	comm	E5: côte de veau	Bos taurus 95%	boeuf
		E6: vache à lait	Bos taurus 100%	boeuf
		E7: rôti de veau	Bos taurus 100%	boeuf
		E8: parmentier	Bos taurus 100%	boeuf
		E9: bolognaise	Bos taurus 100%	boeuf
		E10: beefsteack	Bos taurus 100%	boeuf
		E11: foie de veau	Bos taurus 100%	boeuf
Chèvre ( <i>Capra hircus</i> )	ref	E12: ADN chèvre	Capra hircus 100%	chèvre
		E13: Prélèvement buccal	Capra hircus 100%	chèvre
Mouton ( <i>Ovis aries</i> )	ref	E14: ADN mouton	Ovis aries 95,5%	mouton
		E15: rôti d'agneau	Ovis aries 100%	mouton
Porc ( <i>Sus scrofa</i> )	ref	E16: ADN porc	Sus scrofa 100%	porc
		E17: rôti de porc	Sus scrofa 100%	porc
	comm	E18: jambon	Sus scrofa 100%	porc
		E19: saucisson	Sus scrofa 100%	porc
		E20: saucisse	Sus scrofa 100%	porc
		E21: porc à la chinoise	Sus scrofa 100%	porc
Lapin ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	ref	E22: ADN lapin	Oryctolagus cuniculus 100%	lapin
Lièvre ( <i>Lepus cuniculus</i> )	ref	E22: ADN lièvre	Lepus cuniculus 100%	lièvre
Renne ( <i>Rangifer tarandus</i> )	ref	E23: ADN renne	Rangifer tarandus 100%	Renne
Souris ( <i>Mus musculus</i> )	ref	E24: souris	Mus musculus 100%	souris
Chat ( <i>Felis catus</i> )	ref	E25: Prélèvement buccal	Felis catus 100%	chat
Autruche ( <i>Struthio camelus</i> )	ref	E26: ADN autruche	Struthio camelus 100%	Autruche
	comm	E27: steak d'autruche	Struthio camelus 100%	Autruche
Poulet ( <i>Gallus gallus</i> )	ref	E28: ADN poulet	Gallus gallus 100%	poulet
		E29: cuisse de poulet	Gallus gallus 94,7%	poulet
	comm	E30: poulet rôti	Gallus gallus 100%	poulet
Pintade ( <i>Numida meleagris</i> )	comm	E31: Pintade rôtie	Numida meleagris 100%	Pintade
Dinde ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	ref	E32: ADN dinde	Meleagris gallopavo 100%	dinde
		E33: rôti de dinde	Meleagris gallopavo 100%	dinde
	comm	E34: cuisses de dinde	Meleagris gallopavo 100%	dinde
Oie ( <i>Anser anser</i> )	ref	E35: ADN oie	Anser anser 100%	oie
	comm	E36: oie rôtie	Anser anser 100%	oie
Anguille d'Europe ( <i>Anguilla anguilla</i> )	comm	E37: poisson entier	Anguilla anguilla 100%	Anguille d'Europe
Cabillaud ( <i>Gadus morhua</i> )	ref	E38: ADN cabillaud	Gadus morhua 100%	Cabillaud
	comm	E39: filet de morue salée	Gadus morhua 100%	Cabillaud
Thon albacore ( <i>Thunnus albacares</i> )	ref	E40: ADN thon albacore	Thunnus 100%	thon
	comm	E41: thon albacore en boîte	Thunnus 100%	thon
Thon listao ( <i>Katsuwonus pelamis</i> )	ref	E42: ADN thon listao	Thunnus 94,7%	thon
	comm	E43: thon listao en boîte	Thunnus 94,7%	thon
Saumon d'atlantique ( <i>Salmo salar</i> )	comm	E44: filet de saumon d'atlantique	Salmo salar 100%	saumon d'atlantique
Merlu ( <i>Merluccius merluccius</i> )	ref	E45: ADN merlu	Merluccius 94,4%	Merlu
Maquereau espagnol ( <i>Scomber japonicus</i> )	ref	E46: ADN maquereau espagnol	Scomber japonicus 100%	Maquereau espagnol
Maquereau commun ( <i>Scomber scombrus</i> )	comm	E47: poisson entier	Scomber scombrus 100%	Maquereau commun
Thonine de l'atlantique ( <i>Euthynnus alletteratus</i> )	ref	E48: ADN thonine atlantique	Euthynnus alletteratus 100%	Thonine de l'atlantique
Truite arc en ciel ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	ref	E49: ADN truite arc en ciel	Oncorhynchus mykiss 100%	Truite arc en ciel
	comm	E50: poisson entier	Oncorhynchus mykiss 100%	Truite arc en ciel
Truite de mer ( <i>Salmo trutta fario</i> )	ref	E51: ADN truite de mer	Salmo trutta fario 100%	Truite de mer
Saumon de fontaine ( <i>Salvenius fontinalis</i> )	ref	E52: ADN saumon de fontaine	Salvenius fontinalis 100%	Saumon de fontaine
Ombre chevalier ( <i>Salvenius alpinus</i> )	comm	E53: poisson entier	Salvenius alpinus 100%	Ombre chevalier

Exemple 2 : Détection de plusieurs d'espèces animales dans un échantillon (tableau 2)

- 5 Les conditions expérimentales concernant la préparation des échantillons, la lyse des échantillons et la purification des ADN totaux, la PCR, la vérification de l'amplification et l'identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara) sont identiques à ce qui est décrit dans l'exemple 1.
- 10 Dans cet exemple, plusieurs espèces animales sont simultanément analysées à partir d'un même échantillon. L'analyse est réalisée sur :
- des échantillons de référence (désignés « ref », comme dans l'exemple 1) constitués par :
    - 15 un mélange d'ADN provenant de deux espèces d'animaux différentes, en proportion 50% de chacune des 2 espèces
    - un mélange d'amplicons (obtenus selon le protocole de l'exemple 1), en proportion 80% d'amplicons de bœuf et 20% d'amplicons de dinde ; 50% d'amplicons de bœuf et 50% d'amplicons de dinde ; 20%
    - 20 d'amplicons de bœuf et 80% d'amplicons de dinde,
  - des échantillons commerciaux (désignés « comm », comme dans l'exemple 1), issus de la grande distribution, comprenant plusieurs espèces animales dans un même échantillon.
- Comme présentés dans le tableau 2, ces résultats montrent que
- 25 des mélanges d'espèces peuvent être détectées simultanément dans un même échantillon, que cet échantillon soit constitué d'un mélange d'ADN, d'un mélange d'amplicons ou d'un échantillon commercial comprenant plusieurs espèces.

*Tableau 2 : détection de plusieurs espèces animales dans un échantillon*

Nature de l'échantillon		Composition	% base call Séquence signature	Identification sur puce
Ref	Mélange ADN	50% porc (E16)	S. scrofa 94,7%	porc
		50 %lapin (E22)	O. cuniculus 100%	lapin
		50% poulet (E28)	G. gallus 100%	poulet
		50% dinde (E32)	M. gallopovo 100%	dinde
		50% bœuf (E1)	B. taurus 100%	boeuf
		50% dinde (E32)	M. gallopovo 100%	dinde
	Mélange amplicons	80% bœuf	B. taurus 100%	boeuf
		20% dinde	M. gallopovo 94,1%	dinde
		50% bœuf	B. taurus 100%	boeuf
		50% dinde	M. gallopovo 100%	dinde
		20 % bœuf	B. taurus 100%	boeuf
		80 % dinde	M. gallopovo 100%	dinde
Comm	E54 : Pâté	porc volaille	S. scrofa 100% M. gallopovo 94,1%	porc dinde
	E55 : boudin blanc	porc volaille	S. scrofa 100% M. gallopovo 94,1%	porc dinde

5

Exemple 3: Détection d'une ou plusieurs espèces animales dans les farines destinées à l'alimentation animale.

a) Préparation de l'échantillon

- 10 Les conditions expérimentales concernant la préparation des échantillons sont similaires à ce qui est décrit dans l'exemple 1. Les échantillons sont issus de farines destinées à l'alimentation animale. Ces échantillons (numérotés de F1 à F17) ont été préalablement répertoriés selon 4 catégories, après analyse de la présence de fragments d'os telle
- 15 que décrite par Michard (Revue de l'Alimentation animale, vol. 508, pp 43-48, 1997 ; technique de référence).

On distingue alors des échantillons « négatifs » lorsque le nombre de fragments d'os est inférieurs à 20, des échantillons « traces » lorsqu'il y a plus de 20 fragments d'os mais une proportion en os présents dans l'échantillon, inférieure à 0,01%, des échantillons « à suivre » lorsque la proportion est comprise entre 0,01% et 1‰, et les échantillons « positifs » lorsque la proportion est supérieure à 1‰.

#### b) Lyse de l'échantillon et purification des ADN totaux

Pour la lyse de l'échantillon et la purification des acides nucléiques, on utilise le Dneasy™ Tissue Nécessaire (Qiagen, ref 69504) tel que décrit dans l'exemple 1, à partir de 25 mg de farine. Une adaptation de la technique est réalisée afin d'éliminer les inhibiteurs de la PCR. En effet, ces inhibiteurs (polyphénols, cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), traces de métaux lourds, tanins, carbohydrates, sels ( $\text{NaCl}$ , nitrites)) sont en quantité importante dans les végétaux, et de ce fait dans les farines destinées à l'alimentation animale. Cette adaptation est la suivante :

1- Après la lyse avec le tampon ATL et la protéinase K, du chelex est ajouté lors de l'étape de purification de l'ADN (200µl de InstaGene™ Matrix (BIO-RAD, ref 732-6030).

2- Après incubation de 30 minutes à 56°C, une centrifugation (5 minutes ; 14000 tours/minutes) est réalisée, et l'extraction est réalisée telle que décrite dans le manuel Dneasy™ Tissue Nécessaire de Qiagen.

#### c) PCR

On effectue une PCR en utilisant le nécessaire Ampli Taq gold de Applied Biosystems. On ajoute à 10µl de la suspension d'ADN total extrait de farines le tampon 10X gold buffer, 3,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 100 µM de dNTPs (déoxyribonucleosides triphosphates), 2U de Taq gold polymérase, 0,4µM des amorces euvertébrés CBL et CBHT7 telles que définies dans l'exemple 1 afin d'obtenir 50µl de volume réactionnel final. On réalise un premier cycle de 10 minutes à 95°C de PCR puis 35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 45 sec, 50°C 45 sec, 72°C 2 minutes. Une extension finale de 5 minutes à 72°C est ensuite réalisée.

#### d) Vérification de l'amplification

La vérification de l'amplification est réalisée comme décrit dans l'exemple 1.

e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara).

Cette étape d'identification est réalisée telle que décrite dans l'exemple 1.

5 f) Résultat

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3, et comparés aux résultats obtenus par le protocole classique de l'art antérieur. Il y a parfaite concordance entre les 2 techniques, mais avec, en plus, l'indication de l'espèce dans le cas de l'invention. L'invention permet  
10 de détecter la présence d'une ou plusieurs espèces animales dans des échantillons de farines destinées à l'alimentation animale.

*Tableau 3 : détection d'une ou plusieurs espèces animales dans les farines destinées à l'alimentation animale.*

15

	Protocole classique		Protocole selon l'invention
	Catégorie	Fragments os	
F1	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F2	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F3	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F4	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F5	Traces	< 0,01 %	Aucune espèce détectée
F6	Traces	< 0,01 %	Aucune espèce détectée
F7	Traces	< 0,01 %	Porc
F8	Traces	< 0,01 %	Aucune espèce détectée
F9	Traces	< 0,01 %	Porc, Souris, Bœuf,
F10	A suivre	0,05 %	Porc, Bœuf
F11	A suivre	0,03 %	Porc, Bœuf
F12	A suivre	0,02 %	Porc, Rat, Bœuf
F13	A suivre	0,01 %	Porc
F14	Positif	0,23 %	Porc, Bœuf
F15	Positif	0,23 %	Bœuf, Porc
F16	Positif	4,70 %	Bœuf, Porc, Souris, Dinde
F17	Positif	3,50 %	Bœuf, Souris, Porc, Poulet

Exemple 4 : détection de la classe des d'espèces contenues dans un échantillon (tableau 4)

- 5 L'objectif de cet exemple est d'obtenir une technique permettant de détecter la classe de vertébrés (mammifères, oiseaux, poissons...) de l'animal d'origine de l'ingrédient contenu dans un échantillon alimentaire ou un échantillon de farine destinée à l'alimentation animale.
- 10 Les conditions expérimentales concernant a) la préparation de l'échantillon, b) la lyse de l'échantillon et la purification des ADN totaux, c) la PCR, d) la vérification de l'amplification et e) l'identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara) sont similaires à ce qui est décrit dans l'exemple 1 et 3.
- 15 L'identification de la présence de mammifère et/ou d'oiseaux est déterminée par la présence de signatures spécifiques à chaque classe.
- Par exemple, pour la détection de la présence de mammifères on utilisera la séquence signature M, correspondant à la séquence SEQ N°235 GACACAACAA CAGC, positions 14685 à 14698 (séquence de
- 20 référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases CAA en positions 14689-14690-14691 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5
- 25 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe de mammifères choisis. La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon.
- L'identification de la présence d'oiseaux est déterminée par les
- 30 signatures :
- O1, correspondant à la séquence SEQ N°236 TCCCTAGCCT TCTC, positions 15073 à 15086 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT (positions 15076-15077) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux
- 35 espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la

signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

5 O2, correspondant à la séquence SEQ N°237 ACACTTGCCG GAAC, positions 15098 à 15111 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases **CT** ou **CA** (positions 15101 - 15102) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut

10 rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

15 L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est déterminée par la signature V, correspondant à la séquence SEQ N°238 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases **GC** (en positions 14886 et 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire  
20 correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères et les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléaire du groupe de mammifères et d'oiseaux choisis La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci  
25 dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères et d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de poissons est déterminée par la signature P, correspondant à la séquence SEQ N°239 ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank  
30 n° accession X99772). Les bases **ATA** ou **ATG** (positions 14716-14717-14718 ) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléaire correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le  
35 matériel nucléaire du groupe poissons choisis La présence de ces trois



bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

- Comme présenté dans le tableau 4, cette technique permet de détecter la présence de mammifères et/ou d'oiseaux et/ou de poissons, que ces espèces soient présentes isolément ou en mélange.

*Tableau 4 : détection de classe d'espèces dans un échantillon*

Echantillons	Signatures détectées	interprétation
E1 : ADN bœuf	V et M	mammifère
E16 : ADN porc	V et M	mammifère
E17 : rôti de porc	V et M	mammifère
E12 : ADN chèvre	V et M	mammifère
E13 : chèvre prélèvement buccal	V et M	mammifère
E35 : ADN oie	V et O1 et O2	oiseau
E49 : ADN truite arc en ciel	P	poisson
E51 : ADN truite de mer	P	poisson
Mélange amplicons boeuf / dinde	V et M et O1 et O2	mammifère / oiseau
E15 : rôti d'agneau	V et M	mammifère
F9 : farine « trace »	V et M	mammifère
F1 : farine « négatif »	<i>Pas de signatures positive</i>	<i>pas d'identification</i>
farine	P	poisson

Exemple 5 : amorces universelles d'amplification des vertébrés  
(tableau 5a et 5b)

- 5 L'objectif des expériences présentées dans cet exemple est d'obtenir des amorces encore plus sensibles que celles décrites dans les exemples précédents, et plus universelles pour la détection des espèces en mélanges. En effet, les amorces utilisées dans les exemples 1 à 4 sont très sensibles vis à vis du bœuf, ce qui peut masquer parfois la présence
- 10 d'autres espèces lorsque elles sont présentes en très faible proportion.

Les amorces utilisées dans cet exemple sont les suivantes :

SEQ ID N°240: 5' GACCTCCCAG CCCCATCAAA 3' (séquence CBL 20)

- 15 SEQ ID N°241: 5' **GAAATTAATA CGACTCACTA**  
**TAGGGAGACC ACACAGAATG** ATATTGTCC TCA 3' ( séquence CBHT7 20, avec en gras, la localisation du promoteur de la polymérase T7).

La technique utilisée pour obtenir l'identification sur la puce est telle que décrite dans l'exemple 1a, 1b,1c (avec les amorces modifiées ), 1d, 1e.

- 20 Comme présenté dans le tableau 5a, l'utilisation de ces nouvelles amorces permettent d'obtenir, chez la dinde, un seuil de détection de l'ordre de 1% par comparaison avec les amorces des exemples 1 à 4 où le seuil de détection était de l'ordre de 10%. L'utilisation de ces nouvelles amorces permettent également, dans des
- 25 échantillons commerciaux, provenant de la grande distribution, l'identification d'espèces animales, notamment le mouton, présentes à l'état de trace, qui étaient masquées par la présence de bœuf dans les exemples précédents (tableau 5b).

*Tableau 5 a : seuil de détection de la dinde en mélange avec du boeuf*

		Détection sur puce: % base call			
% ADN		Amorces ex 1 à 4		Amorces ex 5	
E1 : bœuf	E32 : dinde	bœuf	dinde	bœuf	dinde
100	0	100	5,9	100	29,4
99,9	0,1	100	17,6	100	41,2
99	1	100	76,5	100	94,1
90	10	100	100	100	100
50	50	100	100	100	100
1	99	100	100	90	100
0,1	99,9	100	100	60	100
0	100	50	94,1	26,9	100
Seuil de détection		0,10%	10%	1%	1%

5

*Tableau 5b : détection du mouton en mélange avec d'autres espèces*

Produits commerciaux	composition indiquée	détection sur puce : espèces détectées	
		amorces ex 1 à 4	amorces ex 5
E56 : Kebab Burger	Pain, viande hachée précuite (mouton, bœuf), sauce	Bœuf,	Bœuf Mouton
E57 : Boulette couscous	Bœuf, mouton, végétaux	Bœuf	Bœuf Mouton

10

## REVENDICATIONS

1. Procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :
- 5 a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, choisi dans le groupe constitué par
- 10 - les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,
- les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une
- 15 concentration d'environ 0,5 à 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,
- les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement,
- 20 l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 25 c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.
- 30
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de
- 35 signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, consistant en au moins une séquence choisie dans les groupes constitués par

- les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,

- les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou

- les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et

d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon

d'une même espèce animale d'origine et/ou de plusieurs espèces animales d'origine respectivement différentes.

3. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

- 5           a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,  
          b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,  
10           c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences selon b) respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque  
15           desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

4. Utilisation d'une séquence selon la revendication 3, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un  
20 échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce animale.

5. Sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique  
25 d'identification selon la revendication 3.

6. Amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification selon la revendication 3.

30

7. Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 3.

35           8. Biopuce comprenant un support solide comportant une surface développée, sur laquelle est disposée et fixée une multiplicité de

d'une même espèce animale d'origine et/ou de plusieurs espèces animales d'origine respectivement différentes.

3. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :

- 5           a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,  
            b) les séquences complémentaires à chacune des séquences  
            SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de  
            toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise  
            entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à  
10          1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou  
            c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ  
            ID Nos 1 à 232 et des séquences selon b) respectivement, l'homologie  
            s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une  
            suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque  
15          desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite  
            quelconque séquence.

4. Utilisation d'une séquence selon la revendication 3, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un  
20 échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins  
ladite espèce animale.

5. Sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique  
25 d'identification selon la revendication 3.

6. Amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une  
séquence nucléotidique d'identification selon la revendication 3.

30 7. Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 3.

35 8. Biopuce comprenant un support solide comportant une surface développée, sur laquelle est disposée et fixée une multiplicité de

séquences nucléotidiques selon la revendication 3, et ceci selon un arrangement prédéterminé.

9. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on détermine la multiplicité de signaux ou informations avec une biopuce selon la revendication 8.

10. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

- 10 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
- b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec
- 15 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239,
- c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque
- 20 desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

25 11. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences selon la revendication 10 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

30 12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235.

35 13. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236.



séquences nucléotidiques selon la revendication 3, et ceci selon un arrangement prédéterminé.

9. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on détermine la multiplicité de signaux ou informations avec une biopuce selon la revendication 8.

10. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :

- 10 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,  
b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec  
15 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, ou  
c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque  
20 desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

25 11. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences selon la revendication 10 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

30 12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235.

35 13. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236.

14. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237.

5

15. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238.

10

16. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239.

17 Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 10.

18. Procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence selon la revendication 10,

c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et  
d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'un groupe d'espèces animales d'origine.

19. Utilisation des séquences définies dans l'une quelconque des revendications 12 à 16, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

14. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237.

5

15. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238.

10

16. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases ATA en positions 14716-14718 de SEQ ID N°239.

15

17 Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 10.

20

18. Procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

25

b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence selon la revendication 10,

c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et  
d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'un groupe d'espèces animales d'origine.

30

19. Utilisation des séquences définies dans l'une quelconque des revendications 12 à 16, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

35

## LISTAGE DE SEQUENCES

<110> BioMérieux

<120> Procédé de détection et/ou d'identification de l'espèce animale d'origine de la matière animale contenue dans un échantillon.

<130> B05B3851FR/ANIFRAUD

<160> 241

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 1  
ctcctactgg ctatgcac

18

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 2  
gtaatcctac tgctcactc

19

<210> 3

<211> 38

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 3  
ttcggatctc tgctcgccat ctgcctggcc acacaaat

38

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 4

gacacatccc ttgctttctc ctca

24

<210> 5

<211> 33

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 5

ctcccttcta gccatctgct tagccacaca aat

33

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 6

ccgcagacac ttcactcgcc t

21

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 7

caacgggtgct tcgctcttct ttatc

25

<210> 8

<211> 18

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 8

cacttcactc gccttctc

18

<210> 9

<211> 16

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 9

aacctgcacg ccaatg

16

<210> 10

<211> 35

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 10

gggtccctcc tcgccatttg cctgggtcacc caaat

35

<210> 11

<211> 17

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 11

gtcctgccat ggggaca

17

<210> 12

<211> 22

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 12

ctcctactcg ccctcatggc aa

22

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 13

atccgcaacc tgcacgcaa

20

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 14

tcctcagtggt ctaacacatg tcga

24

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 15

cgagacgtca attatgg

17

<210> 16

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 16

atctgcttat ttataca

17

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 17

~~tcctctgtta ctacat~~

17

<210> 18

<211> 17

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 18

tcctcttatt tacagta

17

<210> 19

<211> 27

<212> ADN

<213> Rangifer tarandus

<400> 19

aatattggag tgatcctctt atttaca

27

<210> 20

<211> 17

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 20

acacaggagt cgtcctc

17

<210> 21



<211> 16

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 21

ttgctaactc aaatcc

16

<210> 22

<211> 17

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 22

acccttatag ccactgc

17

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 23

ggcttactac tcgccgcaca tta

23

<210> 24

<211> 17

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 24

ctaaccggct tactact

17

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Columba palumbus

<400> 25  
ggcatttgct tgctaactca aat 23

<210> 26

<211> 19

<212> ADN

---

<213> ~~Acipenser baerii~~

<400> 26  
ctcactcata ggctctgc 19

<210> 27

<211> 17

<212> ADN

<213> Acipenser baerii

<400> 27  
tggctcactc ataggcc 17

<210> 28

<211> 17

<212> ADN

<213> Coturnix coturnix

<400> 28  
ctgcttctca cactaat 17

<210> 29

<211> 16

<212> ADN

<213> Coturnix coturnix

<400> 29

---

tcaccggcct tctact

16

<210> 30

<211> 16

<212> ADN

<213> Coturnix coturnix

<400> 30

tagcaatatg cctcat

16

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 31

cttcggatcg cttctttggcc t

21

<210> 32

<211> 24

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 32

ctccttcttt tggatcatgat aact

24

<210> 33

<211> 20

<212> ADN

<213> Sardina pilchardus

<400> 33

gggcgagggc tctattatgg

20

<210> 34

<211> 17

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 34

attgggagcgag ggctcta

17

<210> 35

---

<211> 20

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 35

gttggtcctcc ttcttttggt

20

<210> 36

<211> 16

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 36

atggagcatc tttttt

16

<210> 37

<211> 17

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 37

ttgggttatgt cttaccg

17

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

---

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 38

tggcctctgt ctageggccc agattctgac agggttgttc ttagccat

48

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 39

tgattcgaag tatgcacgca a

21

<210> 40

<211> 17

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 40

tttgtattta cgccac

17

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 41

cctctgacat cgcaaccgc

19

<210> 42

<211> 19

<212> ADN

<213> *Anguilla anguilla*

<400> 42

atacctttac atagaaaca

19

<210> 43

<211> 16

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 43

gtgggctatg ttctcc

16

<210> 44

<211> 18

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 44

tccctattag cagtctgc

18

<210> 45

<211> 19

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 45

tcattccggaa tctccacgc

19

<210> 46

<211> 21

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 46

catctgtatc ttctttcaca t

21

<210> 47

<211> 23

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 47

gtagcccaca cttgccggaa cgt

23

<210> 48

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 48

ggactttttcc tcgcaat

17

<210> 49

<211> 23

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 49

tgcctaattt ctcaaattct cac

23

<210> 50

<211> 20

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 50

ttcggctcac tgcttggtct

20

<210> 51

<211> 20

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 51  
cactacaccc ccgatgttga 20

<210> 52

<211> 25

<212> ADN

~~<213> Scomber japonicus~~

<400> 52  
tctaccttt tcatggaaac atgaa 25

<210> 53

<211> 36

<212> ADN

<213> Scomber japonicus

<400> 53  
accccgatg ttgagtcagc attcgactca gtcgcc 36

<210> 54

<211> 18

<212> ADN

<213> Anguilla japonica

<400> 54  
tatggatgat tcatccga 18

<210> 55

<211> 21

<212> ADN

<213> Anguilla japonica

<400> 55



gatgattcat ccgaaattta c 21

<210> 56

<211> 17

<212> ADN

<213> Anguilla japonica

<400> 56

ataataactg cattcgt 17

<210> 57

<211> 19

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 57

tattatgggtt cgtacctat 19

<210> 58

<211> 17

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 58

aacctccatg cgaatgg 17

<210> 59

<211> 26

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 59

gcagacacca ctcttgcatc ctcttc 26

<210> 60

<211> 27

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 60

ttctcttctg tggcctacac atgccga

27

<210> 61

---

<211> 17

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 61

tgccatcatca ctcaaatt

17

<210> 62

<211> 18

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 62

cttaaccggc ctctact

18

<210> 63

<211> 28

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 63

caggagtagt cttacttctc accctcat

28

<210> 64

<211> 18

<212> ADN

---

<213> Meleagris gallopavo

<400> 64  
ctcatcactc aaatctta

18

<210> 65

<211> 16

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 65  
ctcctcgtaa tgatga

16

<210> 66

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 66  
ttccttgcaa tgcacta

17

<210> 67

<211> 19

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 67  
atgaaacgtc ggtgtagtc

19

<210> 68

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 68

ggtgtagtcc tctctct

17

<210> 69

<211> 19

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 69

tcattccgcaa catgcacgc

19

<210> 70

<211> 33

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 70

tacacgcccc acgtcgaatc agcattcaac tca

33

<210> 71

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 71

ggttccctgc ttggtct

17

<210> 72

<211> 17

<212> ADN

<213> Anguilla mossambica

<400> 72

aatggagctt ctttctt

17

<210> 73

<211> 26

<212> ADN

<213> Anguilla mossambica

<400> 73

ggactatgtc ttatctctca aatcct

26

<210> 74

<211> 20

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 74

tatccgctat atgcacgcaa

20

<210> 75

<211> 21

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 75

ggagtatgct tgattctaca g

21

<210> 76

<211> 18

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 76

cggatcctat gtattcat

18

<210> 77

<211> 24

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 77  
acattggaat tgtactatta ttcg

24

<210> 78

<211> 16

<212> ADN

~~<213> Canis familiaris~~

<400> 78  
actattatttc gcaacc

16

<210> 79

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 79  
attatccgct atatgc

16

<210> 80

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 80  
caggtttatt cttagc

16

<210> 81

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 81

gcaaccatag ccacag

16

<210> 82

<211> 18

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 82

aaatggcgct tccatatt

18

<210> 83

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 83

taggagtatg cttgat

16

<210> 84

<211> 16

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 84

gacccaaatt atcacc

16

<210> 85

<211> 19

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 85

atccctocta gcagtctgc

19

<210> 86

<211> 16

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 86

atgacccaaa ttatca

16

<210> 87

<211> 18

<212> ADN

<213> Numida meleagris

<400> 87

tgtcgaaatg tccaatac

18

<210> 88

<211> 18

<212> ADN

<213> Equus asinus

<400> 88

agacactaca actgcctt

18

<210> 89

<211> 16

<212> ADN

<213> Equus asinus

<400> 89

gctcctacac attcct

16

<210> 90

<211> 17

<212> ADN



<213> Equus asinus

<400> 90  
atcagacact acaactg

17

<210> 91

<211> 18

<212> ADN

<213> Equus asinus

<400> 91  
tgcctcttta tccacgta

18

<210> 92

<211> 16

<212> ADN

<213> Auxis thazard

<400> 92  
ttggcgtagt tcttct

16

<210> 93

<211> 29

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 93  
cagatgaatt atccaccatc tccatgcta

29

<210> 94

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 94

atgtgaacta cagatgaatt atc

23

<210> 95

<211> 25

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 95

25

ttctcctatt tcttcagta atage

<210> 96

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 96

23

tcctagctat atactacaca tca

<210> 97

<211> 25

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 97

25

gaaatattgg gattctccta tttct

<210> 98

<211> 18

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 98

18

gccttctttg gttccctc

<210> 99

<211> 22

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 99

tctcatctgt tatacacatc tg

22

<210> 100

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 100

tcacgtagga caaggccttt act

23

<210> 101

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 101

gcctttacta cagctcctac acc

23

<210> 102

<211> 21

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 102

ctttgggtcc cacctaggaa t

21

<210> 103

<211> 16

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 103  
teccacctag gaatct 16

<210> 104

<211> 19

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 104  
tgcctcttta ttcacgtag 19

<210> 105

<211> 17

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 105  
attggtgtag tacttct 17

<210> 106

<211> 17

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 106  
tttgcattta ctcacac 17

<210> 107

<211> 17

<212> ADN

<213> Euthynnus alletteratus

<400> 107

ggcctgttcc tcgcaat

17

<210> 108

<211> 16

<212> ADN

<213> Euthymus alletteratus

<400> 108

gcatttactc acacat

16

<210> 109

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 109

tatgtattac cctgagg

17

<210> 110

<211> 30

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 110

gacatcgcca cggcctttac atccgtagca

30

<210> 111

<211> 16

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 111

ccctcctcgg cctctg

16

<210> 112

<211> 21

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 112

ggcctgtttc tcgctataca c

21

<210> 113

<211> 29

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 113

tctgttttagc tgcccaagtc ctcacaggc

29

<210> 114

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 114

ctcggcctct gtttagc

17

<210> 115

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 115

tcctatctat acaaaga

17

<210> 116

<211> 19

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 116  
catcagacat cgcgacggc

19

<210> 117

<211> 16

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 117  
tgactaattc ggaata

16

<210> 118

<211> 20

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 118  
catgctaata gtagcctcttt

20

<210> 119

<211> 17

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 119  
ggttcctatc tttttgt

17

<210> 120

<211> 17

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 120

aaacactgga gtcgtcc

17

<210> 121

<211> 16

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 121

16

gaaatgtgca gtacgg

<210> 122

<211> 20

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 122

20

ggttccctgc tagcagtatg

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 123

18

actggcctcc tattagcc

<210> 124

<211> 17

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 124

17

tgccttatta ctcaaatt

<210> 125



<211> 18

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 125

tgtcgaaatg tgcagtag

18

<210> 126

<211> 17

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 126

accggcggtta tcctcct

17

<210> 127

<211> 20

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 127

tgaaacaccg gcgttatacct

20

<210> 128

<211> 18

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 128

ttttggatcg ctactagg

18

<210> 129

<211> 24

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 129  
cagtaaggat gatttatccg caat

24

<210> 130

<211> 17

<212> ADN

~~<213> Struthio camelus~~

<400> 130  
cacacatgcc ggaacgt

17

<210> 131

<211> 23

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 131  
tcctactaac attaatagca act

23

<210> 132

<211> 16

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 132  
aattttggat cgctac

16

<210> 133

<211> 20

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 133

ctaacagggc tcctactagc

20

<210> 134

<211> 16

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 134

cacagccgac actaca

16

<210> 135

<211> 18

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 135

ctgtcgcgac gttaatta

18

<210> 136

<211> 23

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 136

cctacacctt ctcagagaca tga

23

<210> 137

<211> 21

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 137

tatctgcctg tacatacatg t

21

<210> 138

<211> 17

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 138

attggaatca tactatt

17

<210> 139

<211> 23

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 139

acagctttta tgggatacgt cct

23

<210> 140

<211> 25

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 140

caccggcctc tttttggcca tacac

25

<210> 141

<211> 25

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 141

ggaatcatatc tattatttac agtca

25

<210> 142

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 142  
accagacgcc tcaaccgcct tt

22

<210> 143

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 143  
tcctcctgct tgcaactata gca

23

<210> 144

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 144  
ctcactcctt ggcgcctgcc tgatcctcca aat

33

<210> 145

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 145  
tccaaatcac cacaggacta

20

<210> 146

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 146

atcgccaca tcactcgaga

20

<210> 147

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 147

ctcaccagac gctcaa

17

<210> 148

<211> 29

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 148

ttacggatca tttctctact cagaaacct

29

<210> 149

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 149

atctgcctct tcctacac

18

<210> 150

<211> 16

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 150

ccatgcacta ctcacc

16

<210> 151

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 151

tcctccaaat caccaca

17

<210> 152

<211> 17

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 152

catgctaacg gtgcctc

17

<210> 153

<211> 20

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 153

tttttatttg tctctatata

20

<210> 154

<211> 19

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 154

tttgtctcta tatacatat

19

<210> 155

<211> 18

<212> ADN

<213> Bison bison

<400> 155  
cttctactta cagtaata 18

<210> 156

<211> 18

<212> ADN

---

<213> Bison bison

<400> 156  
cggtcttat accttcct 18

<210> 157

<211> 17

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 157  
tcctaactgg cttatatt 17

<210> 158

<211> 23

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 158  
ggctctctat tgggattatg cct 23

<210> 159

<211> 18

<212> ADN

<213> Lepus europaeus

<400> 159

---



aataatccag atcctaac

18

<210> 160

<211> 16

<212> ADN

<213> *Lepus europaeus*

<400> 160

ctaataatcc agatcc

16

<210> 161

<211> 22

<212> ADN

<213> *Lepus europaeus*

<400> 161

gactcattcg ttacttacac gc

22

<210> 162

<211> 26

<212> ADN

<213> *Euthynnus pelamis*

<400> 162

tatacccctg acgtagaatc agcctt

26

<210> 163

<211> 19

<212> ADN

<213> *Euthynnus pelamis*

<400> 163

atttactccc atattggcc

19

<210> 164

<211> 18

<212> ADN

<213> Euthynnus pelamis

<400> 164

ctgcatttac tcccatat

18

<210> 165

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus giganteus

<400> 165

attcctttata tgccta

16

<210> 166

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus giganteus

<400> 166

tctttatatg cctatt

16

<210> 167

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus giganteus

<400> 167

ctttggctcg ctacta

16

<210> 168

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus giganteus

<400> 168

ttggctcgct actagg

16

<210> 169

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus giganteus

<400> 169

atattcttta tatgcc

16

<210> 170

<211> 20

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 170

ctatttctag cgatacatta

20

<210> 171

<211> 23

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 171

tcctacttat tcatagagac ctg

23

<210> 172

<211> 17

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 172

aacggcgctt ctttctt

17

<210> 173

<211> 24

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 173

aggcctctgc ttagccgcc aaat

24

<210> 174

<211> 22

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 174

ctcatccgtc gtacacatct gc

22

<210> 175

<211> 23

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 175

ggagttgtac tattcctttt agt

23

<210> 176

<211> 19

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 176

ttagccgcc aaatcttaa

19

<210> 177

<211> 34

<212> ADN

<213> Merluccius merluccius

<400> 177

cattataccg caaacgtcga gatagctttc tcat

34

<210> 178

<211> 16

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 178

tcaatgtttt ttatct

16

<210> 179

<211> 17

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 179

tcctctgtta cccatat

17

<210> 180

<211> 24

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 180

gtaatccttc tgctcacagt aata

24

<210> 181

<211> 17

<212> ADN

<213> Macropus rufus

<400> 181  
ggctcatatc tctacaa 17

<210> 182

<211> 17

<212> ADN

---

<213> Macropus rufus

<400> 182  
aggagcctgc ttaatta 17

<210> 183

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus rufus

<400> 183  
gattgatccg caatct 16

<210> 184

<211> 16

<212> ADN

<213> Macropus rufus

<400> 184  
tacggctgat tgatcc 16

<210> 185

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 185

---

gtttgccaca tctgcc

16

<210> 186

<211> 17

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 186

ctatgttttag ctaccca

17

<210> 187

<211> 20

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 187

tatacctccg acatttcaac

20

<210> 188

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 188

cctggaatat cggagt

16

<210> 189

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 189

tcattcgaaa catcca

16

<210> 190

<211> 19

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 190

ttgtactttt acttctcac

19

---

<210> 191

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 191

gctcgtaoct ctacaa

16

<210> 192

<211> 17

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 192

gagttgtact tttactt

17

<210> 193

<211> 20

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 193

cgagatgtta gttacggctg

20

<210> 194

<211> 18

---



<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 194  
gtacttctac tgttcgca

18

<210> 195

<211> 16

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 195  
caggtctttt ctttagc

16

<210> 196

<211> 17

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 196  
tttgggtccc ttctagg

17

<210> 197

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 197  
gtctgcctaa tagtccaaat c

21

<210> 198

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

```
<400> 198
atcattacag gtctttttcatt a
```

&lt;210&gt; 199

&lt;211&gt; 17

<212> ADN

<213> Mus musculus

```
<400> 199
ttccttcatg tcggacg 17
```

<210> 200

<211> 18

<212> ADN

<213> Mus musculus

```
<400> 200
taatagtcca aatcatta                                     18
```

<210> 201

<211> 16

<212> ADN

<213> Mus musculus

```
<400> 201
attggagtag ttctac
```

<210> 202

<211> 16

<212> ADN

<213> Salmo salar

```
<400> 202
gagttgtact tctact
```

<210> 203

<211> 17

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 203  
taggcctatg tctagcc

17

<210> 204

<211> 18

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 204  
gatgtagct atggctga

18

<210> 205

<211> 16

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 205  
tactttctact tctcac  
<210> 206

16

<211> 20

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 206  
ctcatccgta acattcacgc

20

<210> 207

<211> 16

<212> ADN

<213> Capra hircus

<400> 207

tattcataca tatcgg

16

<210> 208

<211> 19

---

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 208

taggcctgtg ccttataat

19

<210> 209

<211> 16

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 209

attcaaattt tcaactg

16

<210> 210

<211> 18

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 210

tctctactag gcctgtgc

18

<210> 211

<211> 21

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

---

<400> 211 tcaaattttc actggcctat t	21
<210> 212	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> Oryctolagus cuniculus	
<400> 212 tgccttataa ttcaaatt	17
<210> 213	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 213 acactacaag tctgatacca taaca	25
<210> 214	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 214 ctatttgcag tcatagc	17
<210> 215	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 215 ggatcctaca ctttcct	17

<210> 216

<211> 22

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 216

atgcctcata gtacaaatcc tc

22

---

<210> 217

<211> 21

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 217

aaacattggg atcctcctac t

21

<210> 218

<211> 17

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 218

ttcctccatg tgggacg

17

<210> 219

<211> 16

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 219

gtagcctca tagtac

16

<210> 220

<211> 19

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 220

tcatccggaa tatccacgc

19

<210> 221

<211> 22

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 221

tggagtagta ttactacttc ta

22

<210> 222

<211> 23

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 222

ggcctatggtt tggccaccca aat

23

<210> 223

<211> 23

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 223

tacttctaac tataatgact gcc

23

<210> 224

<211> 16

<212> ADN

<213> Salvelinus alpinus

<400> 224

ttgggttcact cttagg

16

<210> 225

<211> 18

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 225

ttttcctctg tgtgccat

18

<210> 226

<211> 21

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 226

cctctgtgtg ccatatctgc c

21

<210> 227

<211> 16

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 227

tattattact tctcac

16

<210> 228

<211> 25

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 228

tattggggta gtattattac ttctc

25

<210> 229

<211> 19



<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 229

tctgtatgcc acatttgtc

19

<210> 230

<211> 20

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 230

ctcactataa tgacagcttt

20

<210> 231

<211> 23

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 231

tccgatattt cgacagcttt ttc

23

<210> 232

<211> 20

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 232

atattatatgc atatcgcccg

20

<210> 233

<211> 26

<212> ADN

<213> amorce sequence CDL

<400> 233  
ccatccaaca tctcagcatg atgaaa 26  
<210> 234  
  
<211> 58  
  
<212> ADN  
  
<213> amorce sequence CBHT7

---

<400> 234  
gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaccctca gaatgatatt tgtctca 58

<210> 235  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Bos taurus

<400> 235  
gacacaacaa cagc 14

<210> 236  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Gallus gallus

<400> 236  
tccctagcct tctc 14

<210> 237  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Gallus gallus

<400> 237  
acacttgccg gaac 14

---

<210> 238

<211> 14

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 238

atagccacag catt

14

<210> 239

<211> 14

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 239

ataataacct cttt

14

<210> 240

<211> 20

<212> ADN

<213> amorce sequence CBL 20

<400> 240

gacctcccag ccccatcaaa

20

<210> 241

<211> 53

<212> ADN

<213> amorce séquence CBHT7 20

<400> 241

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acacagaatg atatttgtcc tca

53

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2..**

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 VI / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		IT/SC/B05B3851FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02.00265	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE L'ESPECE ANIMALE D'ORIGINE DE LA MATIERE ANIMALE CONTENUE DANS UN ECHANTILLON			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> BIO MERIEUX			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		MABILAT	
<b>Prénoms</b>		Claude	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	5 rue du Manoir	
	<b>Code postal et ville</b>	69650	SAINT GERMAIN AU MONT D'OR / FR
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		DESVARENNE	
<b>Prénoms</b>		Sabine	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	170 rue Emile Zola	
	<b>Code postal et ville</b>	69150	DECINES CHARPIEU / FR
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>Nom</b>		BABOLA	
<b>Prénoms</b>		Odile	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	25 rue Albert Thomas	
	<b>Code postal et ville</b>	69150	DECINES CHARPIEU / FR
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Dominique GUERRE CPI 921104 22 FEV. 2002			



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IT/SC/B05B3851FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02.00265	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDURE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE L'ESPECE ANIMALE D'ORIGINE DE LA MATIERE ANIMALE CONTENUE DANS UN ECHANTILLON			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> BIO MERIEUX			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LACROIX	
Prénoms		Bruno	
Adresse	Rue	33 chemin de Montlouis	
	Code postal et ville	69230	SAINT GENIS LAVAL / FR
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Dominique GUERRE CPI 921104 22 FEV 2002			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



---

---

---

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**